

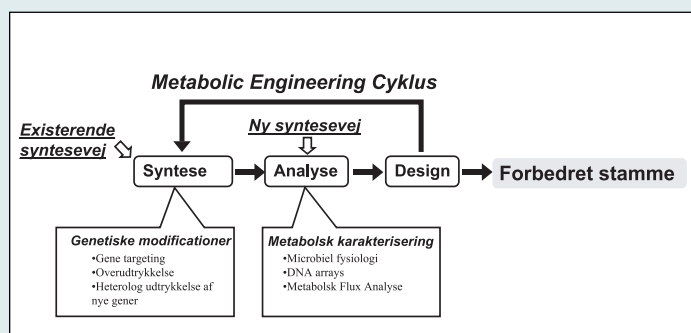
Metabolisk Netværks Analyse

– et vigtigt analytisk værktøj i metabolic engineering

Metabolisk Netværks Analyse (MNA) bruges til at karakterisere den centrale metabolisme af mikrobielle organismer, og det er derfor et vigtigt analytisk værktøj i metabolic engineering. Her beskrives det, hvordan MNA kan bruges i metabolic engineering

Af Jette Thykær og Jens Nielsen, Center for Bioteknologisk Procesforskning, BioCentrum, DTU

MNA kombinerer ^{13}C -mærkningsforsøg med metabolitbalancer, hvorved det er muligt både at identificere og kvantificere de metaboliske fluxe. Desuden giver metoden mulighed for at analysere, i hvilke organeller de forskellige reaktioner i metabolismen finder sted. Gaschromatografi-massespektrometri (GC-MS) benyttes til at bestemme ^{13}C -mærkningsmønstrene af de proteinogene aminosyrer, og mærkningsmønstrene af de centrale metabolitter kan derefter udledes ud fra kendskab til de biokemiske relationer mellem aminosyrerne og de centrale metabolitter. Med resultater fra en adipoyl-7-ADCA-producerende stamme af *Penicillium chrysogenum* illustreres det, hvordan MNA kan anvendes i metabolic engineering



Figur 1. Den iterative cyklus for metabolic engineering.

Metabolic engineering – en ny type stammeoptimering

Der er i tidens løb blevet brugt klassiske stammeudviklingsprogrammer til at optimere industrielle processer, der involverer mikroorganismer såsom penicillinproduktion. Den traditionelle strategi for denne type programmer har været at foretage tilfældige mutationer i mikroorganismens genom, f.eks. med UV-lys, og derefter udvælge stammer med forbedret udbytte.

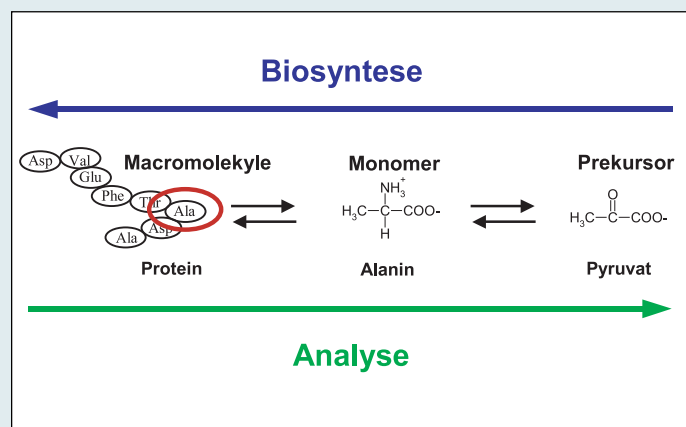
Udviklingen i molekylærbiologi har gjort det muligt at modificere genomet selektivt, dvs. fokusere på enkelte synteseveje og derved optimere stammens cellulære egenskaber. Denne type stammeoptimering kaldes metabolic engineering. I modsætning til den klassiske stammeudvikling, der gør brug af tilfældige mutationer, er metabolic engineering en mere direkte metode til at forbedre de industrielle stammer.

Metabolic engineering er en iterativ proces, der består af et syntesetrin, der involverer de genetiske modifikationer, et analysetrin hvor effekterne af de genetiske ændringer analyseres og et designtrin, der danner grundlag for fremtidige genetiske ændringer (figur 1) [1,2]. MNA anvendes i analysetrinet til at analysere strukturen af det metaboliske netværk og fordelingen af de metaboliske fluxe [3,4,5].

^{13}C -mærkningsforsøg

^{13}C -mærkningsforsøg udgør den eksperimentelle del af MNA. Fermenteringer af mikroorganismer foretages med ^{13}C -mærket substrat som kulstofkilde, f.eks. $[1-^{13}\text{C}]$ -glukose. Når det ^{13}C -mærkede substrat metaboliseres fordeles ^{13}C i metabolitterne, hvilket resulterer i mærkningsmønstre, der reflekterer aktiviteten af de enkelte synteseveje i metabolismen. Mærkningsgraden af et kulstofatom i en metabolit er givet ved den fraktionelle mærkning (FM), der defineres som den fraktion af kulstofatomer, der er ^{13}C . Derimod er den summerede fraktionelle mærkning (SFM) af alle kulstofatomer i en metabolit defineret som summen af de fraktionelle mærkninger af hvert kulstofatom.

MNA fokuserer på at give en detaljeret beskrivelse af den centrale metabolisme, hvorfor information om mærkningsmønstrene af de centrale metabolitter er nødvendig. Det er desværre ikke muligt at måle SFM af de centrale metabolitter, da de kun findes i meget små koncentrationer i cellerne. Derfor bruges en indirekte metode, hvor SFM af de centrale metabolitter bestemmes ud fra målinger af SFM af aminosyrer fra hydrolyserede proteiner vha. GC-MS. Ud fra biokemisk kendskab, til hvordan kulstofatomerne i de centrale metabolitter inkorporeres i aminosyrerne, udledes SFM af de centrale metabolitter (figur 2).



Figur 2. Indirekte metode til bestemmelse af mærkningsmønstrene af de centrale metabolitter ud fra mærkningsmønstrene af de proteinogene aminosyrer målt vha. GC-MS.

GC-MS-målinger

SFM af de proteinogene aminosyrer måles vha. en hurtig og robust GC-MS-metode (figur 3). For at kunne analysere aminosyrer vha. GC-MS er det nødvendigt at derivatisere dem, så de bliver flygtige. I gaschromatografen separeres de derivatiserede aminosyrer, hvorefter de ioniseres i massespektrometret. Ioniseringen medfører fragmentering af aminosyre-



Figur 3. Skematisk oversigt over den anvendte GC-MS-metode.

derivaterne, hvilket betyder, at flere fragmenter afledt af den samme aminosyre analyseres i massespektrometret. Herved opnås komplementær information omkring aminosyrernes mærkningsmønstre.

GC-MS-metoden udnytter at ^{13}C er tungere end ^{12}C , hvilket resulterer i såkaldte ion-clustre i massespektret, der viser massefordelingen i de forskellige fragmenter. Ud fra toppenes intensitet i massespektret bestemmes SFM af fragmenterne (figur 3). De estimerede SFM anvendes til både kvantitativt og kvalitativt at karakterisere det metaboliske netværk i form af netværksstruktur og fluxfordeling.

Fluxestimering

Til estimering af de metaboliske fluxe anvender MNA en kombination af metabolit- og isotopbalancer. For at kunne opstille en matematisk model er det nødvendigt at vide, hvordan strukturen af det metaboliske netværk ser ud. Denne information opnås ved en detaljeret gennemgang af de målte mærkningsmønstre, hvor overensstemmelse mellem det formodede netværk og mærkningsdata undersøges. Baseret på netværksstrukturen og de målte mærkningsdata estimeres fluxfordelingen i det metaboliske netværk, eksemplificeret på figur 4, vha. et computerprogram.

Input til den matematiske model inkluderer biomassesammensætningen, mærkningsmønstre af aminosyrer og produktudbytte. For yderligere information omkring den matematiske modellering og det anvendte computerprogram til fluxestimering se [4].

En kvantitativ undersøgelse af metabolismen er specielt nyttig, når man ønsker at sammenligne fluxfordelingerne af en genetisk modificeret stamme og den korresponderende reference-stamme, eller når forskellen i fluxfordelingen ved forskellige vækstbetingelser ønskes under-

Figur 4. Fluxfordelinger for to kemostater af en adipoyl-7-ADCA producerende stamme af *Penicillium chrysogenum*.

Værdierne i fed refererer til de estimerede fluxe med sidekædeprekursoren adipat i vækstmediet, mens værdier i kursiv refererer til de estimerede fluxe uden adipat i vækstmediet. Forkortelser: Glc, glucose; G6P, glucose-6-phosphat; F6P, fructose-6-phosphat; G3P, glyceraldehyd-3-phosphat; PYR, pyruvat; AcCoA(cyt), cytosolisk acetyl-CoA; AcCoA (mit), mitokondriel acetyl-CoA; OAA, oxaloacetat; Isocit, isocitrat; 2-KG, 2-ketoglutarat; FUM, fumarat; SUC, succinat; Val, valin; Cys, cystein.

søgt. Figur 4 viser en sammenligning af fluxfordelinger af en adipoyl-7-ADCA producerende stamme af *Penicillium chrysogenum* med og uden sidekædeprekursoren adipat i vækstmediet. ^{13}C -mærkningsresultaterne fra denne undersøgelse viste, at adipat bliver nedbrudt til AcCoA og succinyl-CoA. Desuden bliver den anaplerotiske flux fra pyruvat til oxaloacetat erstattet af adipatnedbrydningen [7]. Da nedbrydningen af adipat er en uønsket sidereaktion i produktionen af 7-ADCA, bør fremtidig forskning fokusere på at eliminere de enzymer, der er ansvarlige for denne nedbrydning.

Konklusion

MNA har vist sig at være et værdifuldt analytisk værktøj i metabolic engineering. Metoden har været anvendt til metabolisk karakterisering af adskillige mikroorganismer, f.eks. gær [8], filamentøse svampe [9], filamentøse bakterier [10] og mælkesyrebakterier [11]. Resultaterne af disse studier har givet information omkring effekten af de genetiske ændringer foretaget i syntesedelen af metabolic engineering. Desuden har fortolkningen af resultaterne medført identifikation af nye mål for genetiske modifikationer, hvilket illustrerer, hvordan MNA kan anvendes i metabolic engineering.

Note

DSM Anti-Infectives takkes for finansiel støtte til den beskrevne forskning

E-mail-adresser:

Jette Thykær: jt@biocentrum.dtu.dk

Jens Nielsen: jn@biocentrum.dtu.dk

Referencer

1. Bailey, J.: Science, **252**, 1668-1675 (1991)
2. Nielsen, J.: Appl. Microbiol. Biotechnol., **55**, 263-283 (2001)
3. Wiechert, W.: Metabol. Eng., **3**, 195-206 (2001)
4. Christensen, B., Nielsen, J.: Biotechnol. Bioeng., **68**, 652-659 (2000)
5. Christensen, B., Nielsen, J.: Adv. Biochem. Eng. Biotechnol., **66**, 209-231 (1999)
6. Christensen, B., Nielsen, J.: Metabol. Eng., **1**, 282-290 (1999)
7. Thykær, J., Christensen, B., Nielsen, J.: Metabol. Eng., **4**, 151-158 (2002)
8. Gombert, A.K., dos Santos, M.M., Christensen, B., Nielsen, J.: J. Bacteriol., **183**, 1441-1451 (2001)
9. Christensen, B., Thykær, J., Nielsen, J.: Appl. Microbiol. Biotechnol., **54**, 212-217 (2000)
10. Jonsbu, E., Christensen, B., Nielsen, J.: Appl. Microbiol. Biotechnol., **56**, 93-100 (2001)
11. Jensen, N.B., Christensen, B., Nielsen, J., Villadsen, J.: Biotechnol. Bioeng., **78**, 11-16 (2002)

